

91.06.83  
91.11.99

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 06 JAN 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

5899/6283  
1999年 8月 4日

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第221640号

出願人  
Applicant(s):

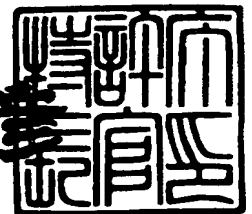
武田薬品工業株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3087732

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99154

【提出日】 平成11年 8月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 07/00  
C12N 15/12

【発明の名称】 新規ポリペプチドおよびそのDNA

【請求項の数】 27

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 1  
4 0 2 号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3 丁目 1 7 番地 6 ロイヤルシティ  
並木 3 0 2 号

【氏名】 福住 昌司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 3  
0 3 号

【氏名】 藤井 亮

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市板谷 1 丁目 7 1 1 番地の 8 3

【氏名】 細谷 昌樹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市南向陽町 1 丁 2 番 8 号

【氏名】 北田 千恵子

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第 60030号

【出願日】 平成11年 3月 8日

【整理番号】 A99040

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第106812号

【出願日】 平成11年 4月14日

【整理番号】 A99072

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第166672号

【出願日】 平成11年 6月14日

【整理番号】 A99115

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

特平 1 1 - 2 2 1 6 4 0

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規ポリペプチドおよびそのDNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 2】実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33 または配列番号：50 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 3】請求項 1 記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 4】配列番号：1 の第 81 番目 (Met) ないし第 92 番目 (Phe) のアミノ酸残基を含有してなる請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 5】配列番号：1 の第 101 番目 (Ser) ないし第 112 番目 (Ser) のアミノ酸残基を含有してなる請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 6】配列番号：1 の第 124 番目 (Val) ないし第 131 番目 (Phe) のアミノ酸残基を含有してなる請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

【請求項 7】請求項 1 記載のポリペプチドの部分ペプチドのアミドまたはその塩。

【請求項 8】請求項 1 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA。

【請求項 9】配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表される塩基配列を有する請求項 8 記載の DNA。

【請求項 1 0】請求項 3 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する DNA。

【請求項 1 1】配列番号：2 で表される塩基配列の第 2 4 1 番目ないし第 2 7 6 番目の塩基を含有してなる請求項 1 0 記載の DNA。

【請求項 1 2】配列番号：2 で表される塩基配列の第 3 0 1 番目ないし第 3 3 6 番目の塩基を含有してなる請求項 1 0 記載の DNA。

【請求項 1 3】配列番号：2 で表される塩基配列の第 3 7 0 番目ないし第 3 9 3 番目の塩基を含有してなる請求項 1 0 記載の DNA。

【請求項 1 4】請求項 8 または請求項 1 0 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 1 5】請求項 1 4 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 1 6】請求項 1 5 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 3 記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

【請求項 1 7】請求項 1 記載のポリペプチド、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 1 8】請求項 8 または請求項 1 0 記載の DNA または請求項 1 7 記載の抗体を含有してなる診断剤。

【請求項 1 9】請求項 8 または請求項 1 0 記載の DNA に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するアンチセンス DNA。

【請求項 2 0】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤。

【請求項 2 1】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 22】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 23】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 22 記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 25】請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項 24 記載のスクリーニング用キット。

【請求項 26】請求項 22 記載のスクリーニング方法または請求項 24 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドも

くはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 2 7】 請求項 2 2 記載のスクリーニング方法または請求項 2 4 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、請求項 3 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規ポリペプチド（本明細書においては、新規生理活性ポリペプチドと称する場合もある。）、その部分ペプチドおよびそれらをコードする DNA などに関する。特に、RFamide 様構造を有することを特徴とする新規ポリペプチドおよびその部分ペプチドなどに関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ペプチドは代謝、成長、生殖、恒常性維持、精神活動、生体防御など生体の機能を調節するための分子として重要な役割を担っている。これらのペプチドは細胞膜上の特異的な受容体に結合することによりその情報を細胞に伝える。これまでこのような生理活性ペプチドの多くは、その生理活性に基づいて組織抽出物等から単離されその構造が決定されてきた。また最近では受容体を利用して組織抽出物等から生理活性ペプチドを単離することもなされるようになってきた。

一方、最近のゲノムや cDNA の配列解析の急速な進展により、膨大な DNA 情報が入手可能になった。これらの DNA の中にはこれまで未知であった生理活性ペプチドをコードするものが含まれているものと推定される。しかし生理活性ペプチドは非常に短いアミノ酸配列しか持たないものが多く、ゲノム DNA 配列や Expressed Sequence Tag (EST) から、既知の生理活性ペプチドのと一部類似した配列あるいは共通のモチーフを有する未知の生理活性ペプチドを探そうとしても、類似した配列は生理活性ペプチドとは全く無関係な蛋白の遺伝子や非翻訳領域の DNA 配



列中にも頻繁に見出されるため、それらの中からどれが本当の生理活性ペプチドであるかどうかを確定することは非常に困難であった。

生理活性ペプチドの 1 種である FMRFamide は二枚貝のビノスワスガレイの神経節より初めて単離、構造決定されたペプチドである (Price D.A. & Greenberg, M.J., *Science*, 197, 670-671, 1977)。その後、C 末端に RFamide 構造を持つペプチドやそれに類似の構造を持つペプチドが無脊椎動物で多くの種に広く分布することが分かってきた。特にセンチュウにおいては多くの RFamide 構造を有するペプチドが存在していることが報告されており、しかもそれらの多くは一つの遺伝子上に複数個が連続して乗っていることが知られている (Nelson, L. S., et al., *Molecular Brain Research* 58, 103-111, 1998)。

一方、脊椎動物において RFamide 構造を有する FMRFamide 様のペプチドとしては、鶏の脳から LPLRFamide が単離同定されているが、その遺伝子構造は未だに明らかにされていない (Dockray, G.J. et al., *Nature*, 305, 328-330, 1983)。また魚類では最近 RFamide 構造を有するペプチドとして C-RFa が報告されている。哺乳動物における RFamide 構造を有するペプチドとしてはウシから精製単離された 2 種のペプチド (Yang, H.-Y. T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7757-7761, 1985) とそれに対応すると考えられるヒト cDNA から同定された neuropeptide SF (NSF) および neuropeptide AF (NAF) がある。また最近我々は RFamide 構造を有するヒト、ウシ、ラット Prolactin-releasing peptide (PrRP) (Hinuma, S., et al., *Nature*, 393, 272-276, 1998) を同定している。

FMRFamide ペプチドの生理活性に関してはさまざまな報告がある。例えば FMRFamide の作用としては、心臓拍動の促進や抑制、各種歯舌筋や内臓筋、各種牽引筋の収縮や弛緩、さらには神経細胞の過分極や脱分極等が知られている。また PrRP に関してはプロラクチン放出促進活性が、また LPLRFamide に関しても神経細胞の刺激効果や、血圧上昇作用等が報告されている。

以上のように RFamide 構造を持つペプチドに関しては多くの重要な生理作用が報告されている。しかし NSF、NAF、PrRP 以外に哺乳動物で知られている RFamide あるいはそれに類似する構造を有するペプチドが存在するかどうかは全く知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、未知のRFamide様構造を持つポリペプチド（ペプチド）を見出し、それを利用した新たな生理活性物質を含有してなる疾患の予防・治療・診断剤の開発が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、EST等の配列情報を基にプライマーを作製し、ヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とするRT-PCRにより、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られたcDNAにコードされるポリペプチドが有用なC末端がLPLRFamide様、LPLRSamide様、LPQRFamide様またはLPLRLamide様のペプチドであることを見出し、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(3) 上記(1)記載のポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(4) 配列番号：1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(5) 配列番号：1の第101番目(Ser)ないし第112番目(Ser)のアミノ

酸残基を含有してなる上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（６）配列番号：１の第１２４番目（Val）ないし第１３１番目（Phe）のアミノ酸残基を含有してなる上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（７）上記（１）記載のポリペプチドの部分ペプチドのアミドまたはその塩、

（８）上記（１）記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

（９）配列番号：２、配列番号：９、配列番号：１５、配列番号：１９、配列番号：３４または配列番号：５１で表される塩基配列を有する上記（８）記載のDNA、

（１０）上記（３）記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

（１１）配列番号：２で表される塩基配列の第２４１番目ないし第２７６番目の塩基を含有してなる上記（１０）記載のDNA、

（１２）配列番号：２で表される塩基配列の第３０１番目ないし第３３６番目の塩基を含有してなる上記（１０）記載のDNA、

（１３）配列番号：２で表される塩基配列の第３７０番目ないし第３９３番目の塩基を含有してなる上記（１０）記載のDNA、

（１４）上記（８）または上記（１０）記載のDNAを含有する組換えベクター

（１５）上記（１４）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（１６）上記（１５）記載の形質転換体を培養し、上記（１）記載のポリペプチドまたは上記（３）記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

（１７）上記（１）記載のポリペプチド、上記（３）記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩に対する抗体、

（１８）上記（８）または上記（１０）記載のDNAまたは上記（１７）記載の

抗体を含有してなる診断剤、

(19) 上記(8)または上記(10)記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、

(20) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤、

(21) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(22) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(23) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(22)記載のスクリーニング方法、

(24) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(25) 上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(24)記載のスクリーニング用キット、

(26) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(24)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、および

(27) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(24)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

#### 【0006】

さらには、本発明は、

(28) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(29) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）の

アミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の 1 ～ 2 0 個以上（好ましくは 1 ～ 1 5 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個以上、より好ましくは、1 ～ 3 個以上）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（3 0）上記（8）または（1 0）記載の DNA をコードする塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

（3 1）上記（3 0）記載の DNA を含有する組換えベクター、

（3 2）上記（3 1）記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

（3 3）上記（3 2）記載の形質転換体を培養し、上記（3 0）記載の DNA にコードされるポリペプチドを生成し、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記（3 0）記載の DNA でコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

（3 4）上記（3 3）記載の製造法で製造される、上記（3 0）記載の DNA でコードされるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

#### 【0 0 0 7】

（3 5）（i）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体を接触させた場合と、（ii）上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体および試験化合物を接触させた場合における、上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を測定し、比較することを特徴とする上記（2 2）記載のスクリーニング方法、

（3 6）受容体が配列番号：3 7 で表されるアミノ酸配列を含有してなるポリペ

プチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である上記（35）のスクリーニング方法、

（37）上記（22）記載のスクリーニング方法または上記（24）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（38）上記（22）記載のスクリーニング方法または上記（24）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

【0008】

（39）上記（17）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（1）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（3）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法、および

（40）被検液と担体上に不溶化した上記（17）記載の抗体および標識化された上記（17）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担

体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、上記（３）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量法などを提供する。

【 0 0 0 9 】

#### 【発明の実施の形態】

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。



## 【0010】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第22～180番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列など）を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの受容体を発現する細胞に添加することにより発現する細胞刺激活性（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の磷酸化、C-fosの活性化、細胞外pHの変動などがあげられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。従って、細胞刺激活性などの活性が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

細胞刺激活性などの測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

## 【0011】

また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1

～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

#### 【0012】

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基( $-COOH$ )またはカルボキシレート( $-COO^-$ )であるが、C末端がアミド( $-CONH_2$ )またはエステル( $-COOR$ )であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル

、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $C_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $C_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $C_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $C_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $C_{1-2}$ アルキル基などの $C_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイルなどの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド（図1）、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド（図3）、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するウシ由来のポリペプチド（図4）、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のポリペプチド（図5）、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチド（図7）、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチドなどが用いられる。

また、本発明のポリペプチドは下記の部分ペプチドの前駆体であってもよく、この場合には、必ずしも下記の部分ペプチドの有する活性（例、細胞刺激活性な

ど)を有する必要はない。

【0013】

本発明のポリペプチドの部分ペプチドとしては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドであって、好ましくは、細胞刺激活性（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の磷酸化、C-fosの活性化、細胞外pHの変動などを有するものであればいかなるものでもよい。

本発明のポリペプチドの部分ペプチドとして好ましくは、R Famide、R SamideまたはR Lamide構造を有するペプチドが好ましい。

R Famide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Phenylalanine（フェニルアラニン）- $\text{NH}_2$ 構造になっていることをいい、R Samide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Serine（セリン）- $\text{NH}_2$ 構造になっていることをいい、R Lamide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Leucine（ロイシン）- $\text{NH}_2$ 構造になっていることを意味する。

これらペプチドの中でも、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）、第101番目（Ser）～112番目（Ser）、第124番目（Val）～131番目（Phe）、第1番目（Met）～第92番目（Phe）、第1番目（Met）～112番目（Ser）または第1番目（Met）～131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。特にこれらのペプチドのアミド体が好ましい。具体的には配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された（ $-\text{CONH}_2$ ）ペプチド（配列番号：39）、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～112番目（Ser）のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された（ $-\text{CONH}_2$ ）ペプチド（配列番号：41）および配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目（Val）～131番目（Phe）のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された（ $-\text{CONH}_2$ ）ペプチド（配列番号：40）などがあげられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

## 【0014】

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。なかでも、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）であるものが好ましい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のポリペプチドと同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも細胞刺激活性などを有する必要はない。

## 【0015】

本発明のポリペプチドポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたは部分ペプチドポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

#### 【0016】

本発明のポリペプチド、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直

接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

## 【0017】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

## 【0018】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状ア

ルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

#### 【0019】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-2



0℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

#### 【0020】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、①配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するポリペプチドをコードする DNA、②配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するポリペプチドをコードする DNA などであれば何れのものでもよい。

【0023】

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる DNA としては、例えば、それぞれ配列番号：2 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に

記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19～40 mM、好ましくは約 19～20 mMで、温度が約 50～70℃、好ましくは約 60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mMで温度が約 65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

#### 【0024】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列

番号：3 4 または配列番号：5 1 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードする DNA の部分塩基配列を有する DNA などが用いられる。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：1 5、配列番号：1 9、配列番号：3 4 または配列番号：5 1 で表わされる塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドをコードする DNA としてより具体的には、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ～1 1 2 番目 (Ser)、第 1 2 4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe)、第 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 番目 (Met) ～1 1 2 番目 (Ser) または第 1 番目 (Met) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する DNA を含有する DNA などが用いられる。

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA としては、配列番号：4 2 で表される塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 0 1 番目 (Ser) ～1 1 2 番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA としては、配列番号：4 3 で表される塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 2 4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を含有する DNA としては、配列番号：4 4 で表される塩基配列を有する DNA を含有する DNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：45で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～112番目（Ser）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：46で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、および

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の、第1番目（Met）～131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしては、配列番号：47で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

#### 【0025】

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-G（宝酒造（株））、Mutant<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

#### 【0026】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞で

ある場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0027】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0028】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, J



A221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

【0029】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞

胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

# 【0030】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、

無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

【0031】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15～43℃で約 3～24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30～40℃で約 6～24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 巻, 5330 (1984)] があげられる。培地の pH は約 5～8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃～35℃で約 24～72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2～6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃で約 3～5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5

～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

#### 【0032】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水

性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【 0 0 3 3 】

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【 0 0 3 4 】

本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩（以下、抗体の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位

にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計 2 ～ 1 0 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2 ～ 5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくは PEG が用いられる。

#### 【 0 0 3 5 】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ～ 2 0 : 1 程度であり、PEG（好ましくは PEG 1 0 0 0 ～ PEG 6 0 0 0）が 1 0 ～ 8 0 % 程度の濃度で添加され、2 0 ～ 4 0 ℃、好ましくは 3 0 ～ 3 7 ℃ で 1 ～ 1 0 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン

抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0036】

##### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 【0037】

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造するこ

とができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ～ 20、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 10 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

#### 【0038】

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをコードする DNA（以下、アンチセンス DNA の説明においては、これらの DNA を本発明の DNA と略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンス DNA としては、本発明の DNA に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス DNA であってもよい。

本発明の DNA に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明の DNA に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の DNA の相補鎖）の全塩基配列あるいは



部分塩基配列と約 70%以上、好ましくは約 80%以上、より好ましくは約 90%以上、最も好ましくは約 95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明の DNA の相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドの N 末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 70%以上、好ましくは約 80%以上、より好ましくは約 90%以上、最も好ましくは約 95%以上の相同性を有するアンチセンス DNA が好適である。これらのアンチセンス DNA は、公知の DNA 合成装置などを用いて製造することができる。

## 【0039】

以下に、本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のポリペプチド等と略記する場合がある）、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをコードする DNA（以下、本発明の DNA と略記する場合がある）、本発明のポリペプチド、部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンス DNA の用途を説明する。

## 【0040】

(1) 本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のポリペプチドは細胞刺激活性などを有しているので、本発明のポリペプチドをコードする DNA に異常があったり、欠損している場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエ

ンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の種々の疾病が発症する可能性が高い。

従って、本発明のポリペプチド等および本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチド等を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチド等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペプチド等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチド等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチド等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

ンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の種々の疾病が発症する可能性が高い。

従って、本発明のポリペプチド等および本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチド等を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチド等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペプチド等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチド等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチド等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

## 【0041】

本発明のポリペプチド等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチド等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保

存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

#### 【0042】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチド等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該ポリペプチド等を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチド等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該ポリペプチド等を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0043】

##### （2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチド等は細胞刺激活性などを有するため、本発明のポリペプチド等の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病

性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘带状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

従って、本発明のポリペプチド等は、本発明のポリペプチド等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

（1）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能（例えば、細胞刺激活性など）を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

（2）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそ

の塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体を接触させた場合と、(ii) 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩にその受容体および試験化合物を接触させた場合における、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法などを提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のポリペプチド等の細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

#### 【 0 0 4 4 】

本発明のポリペプチド等の細胞刺激活性などは、自体公知の方法、例えば、Do ckray, G.J. et al., *Nature* ,305, 328-330, 1983, Fukusumi, S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 157-163, 1997, Hinuma, S., et al., *Nature*, 393, 272-276, 1998, Tatemoto, K., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 471-476, 1998.などに記載の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のポリペプチド等を、スク

リーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチド等の標品を調製する。バッファーには、pH 約 4～10（望ましくは、pH 約 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のポリペプチド等と基質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

## 【0045】

例えば、上記（ii）の場合における細胞刺激活性などが上記（i）の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上上昇させる試験化合物を本発明のポリペプチド等の細胞刺激活性などを促進する化合物として、一方、上記（ii）の場合における細胞刺激活性などが上記（i）の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害する試験化合物を本発明のポリペプチド等の細胞刺激活性などを阻害する化合物として選択することができる。

## 【0046】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットは本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の受容体をさらに含有するものが好ましい。

## 【0047】

本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の受容体（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）として具体的には、例えば、配列番号：37 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などがあげられる。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維



細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0048】

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方

法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：37で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：37で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：37で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

#### 【0049】

具体的には、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%

以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

【0050】

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～10 個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1～20 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～10 個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは 1～5 個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは C 末端が通常カルボキシル基 ( $-COOH$ ) またはカルボキシレート ( $-COO^-$ ) であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C 末端がアミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) であってもよい。

さらに、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N 末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N 端側が生体内で切断され生成した Gln がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは C 末端が通常カルボキシル基 ( $-COOH$ ) またはカルボキシレート ( $-COO^-$ ) であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C 末端がアミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン

酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

#### 【0051】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、前述のポリペプチド合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の合成は上述の本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩における合成方法と同様の方法により合成することができる。

#### 【0052】

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(即ち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(即ち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：38で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：38で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：38で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：38で表わされる塩基配列と約70以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

#### 【0053】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：38で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

## 【0054】

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（１）配列番号：３８で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または（２）配列番号：３８で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：３８で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：３８で表わされる塩基配列と約７０以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

## 【0055】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。



## 【0056】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチド等を含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとしてすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

一方、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することが

できる。

【 0 0 5 7 】

(3) 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量

本発明のポリペプチド等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチド等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチド等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチド等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチド等の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチド等の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

【 0 0 5 8 】

また、本発明のポリペプチド等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のポリペプチド等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチド等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した

抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

#### 【0059】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる

等の目的で 2 種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチド等の測定法においては、1 次反応と 2 次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチド等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1 次反応および 2 次反応に用いられる抗体は、例えば、2 次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチド等の C 端部を認識する場合、1 次反応で用いられる抗体は、好ましくは C 端部以外、例えば N 端部を認識する抗体が用いられる。

【0060】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原 (F) と、抗体と結合した標識抗原 (B) とを分離し (B/F 分離)、B、F いずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F 分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第 2 抗体などを用いる液相法、および、第 1 抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第 1 抗体は可溶性のものを用地第 2 抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0061】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特

別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチド等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチド等の濃度を定量することによって、(1)本発明のポリペプチド等の濃度の減少または増加が検出された場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感

染症，高カルシウム血症，高コレステロール血症，高グリセリド血症，高脂血症，感染症，インフルエンザ感染症，インシュリン依存性糖尿病（I型），侵襲性ブドウ球菌感染症，悪性黒色腫，がん転移，多発性骨髄腫，アレルギー性鼻炎，腎炎，非ホジキン性リンパ腫，インシュリン非依存性糖尿病（II型），非小細胞肺癌，臓器移植，骨関節炎，骨軟化症，骨減少症，骨粗鬆症，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺癌，脊髄損傷，胃がん，全身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，心弁膜症，血管性／多発梗塞痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチド等を検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチド等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチド等の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

#### 【0062】

#### （4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of

the Natinal Academy of Sciences of the United States of America) , 第8  
6巻, 2766~2770頁(1989年)) などにより実施することができる

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過多が検出された場合は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(I型)、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等である可能性が高いと診断することができる。

【0063】

#### (5) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼

吸促迫症候群，アルコール性肝炎，アルツハイマー病，喘息，動脈硬化，アトピー性皮膚炎，バクテリア肺炎，膀胱がん，骨折，乳がん，過食症，多食症，火傷治癒，子宮頸部がん，慢性リンパ性白血病，慢性骨髄性白血病，慢性脾炎，肝硬変，大腸がん（結腸／直腸がん），クローン病，痴呆，糖尿病性合併症，糖尿病性腎症，糖尿病性神経障害，糖尿病性網膜症，胃炎，ヘリコバクター・ピロリ感染症，肝不全，A型肝炎，B型肝炎，C型肝炎，肝炎，単純ヘルペスウイルス感染症，水痘帯状疱疹ウイルス感染症，ホジキン病，エイズ感染症，ヒトパピローマウイルス感染症，高カルシウム血症，高コレステロール血症，高グリセリド血症，高脂血症，感染症，インフルエンザ感染症，インシュリン依存性糖尿病（I型），侵襲性ブドウ球菌感染症，悪性黒色腫，がん転移，多発性骨髄腫，アレルギー性鼻炎，腎炎，非ホジキン性リンパ腫，インシュリン非依存性糖尿病（II型），非小細胞肺癌，臓器移植，骨関節炎，骨軟化症，骨減少症，骨粗鬆症，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺癌，脊髄損傷，胃がん，全身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，心弁膜症，血管性／多発梗塞痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全，瀕尿，尿毒症，または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用する



ることできる。

【0064】

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチド等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、頻尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の神経疾患患者の治療・予防のために使用

する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

#### 【0065】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコー

ルなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5 ～ 5 0 0 m g、とりわけ注射剤では 5 ～ 1 0 0 m g、その他の剤形では 1 0 ～ 2 5 0 m g の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### 【 0 0 6 6 】

#### ( 7 ) D N A 転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチド等をコードする D N A（以下、本発明の外来性 D N A と略記する）またはその変異 D N A（本発明の外来性変異 D N A と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- ( 1 ) 本発明の外来性 D N A またはその変異 D N A を有する非ヒト哺乳動物、
- ( 2 ) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第 ( 1 ) 記載の動物、
- ( 3 ) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第 ( 2 ) 記載の動物、および
- ( 4 ) 本発明の外来性 D N A またはその変異 D N A を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性 D N A またはその変異 D N A を有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明の D N A 転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に 8 細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法などにより目的とする D N A を転移することによって作出することが

できる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

【0067】

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDN

Aを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0068】

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロブラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテインナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA

、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ  $\beta$  アクチンプロモーターなどが好適である。

#### 【0069】

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持

することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

【0070】

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドに関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0071】

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラス

ミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

#### 【0072】

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明



のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0073】

#### (8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0074】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

## 【0075】

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロス

することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

#### 【0076】

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-1000$  U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約 $37^{\circ}\text{C}$ で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常 $0.001-0.5\%$ トリプシン/ $0.1-5$  mM EDTA、好ましくは約 $0.1\%$ トリプシン/ $1$  mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に

播種する方法などがとられる。このような継代は、通常 1 - 3 日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

E S 細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年 ; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年 ; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年]、本発明の E S 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

#### 【 0 0 7 7 】

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明の DNA と入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明の DNA をノックアウトさせることができる。

本発明の DNA がノックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた

場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

#### 【0078】

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA

発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【 0 0 7 9 】

( 8 a ) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄

膜炎，急性心筋梗塞，急性膵炎，急性ウイルス脳炎，成人呼吸促迫症候群，アルコール性肝炎，アルツハイマー病，喘息，動脈硬化，アトピー性皮膚炎，バクテリア肺炎，膀胱がん，骨折，乳がん，過食症，多食症，火傷治癒，子宮頸部がん，慢性リンパ性白血病，慢性骨髄性白血病，慢性膵炎，肝硬変，大腸がん（結腸／直腸がん），クローン病，痴呆，糖尿病性合併症，糖尿病性腎症，糖尿病性神経障害，糖尿病性網膜症，胃炎，ヘリコバクター・ピロリ感染症，肝不全，A型肝炎，B型肝炎，C型肝炎，肝炎，単純ヘルペスウイルス感染症，水痘帯状疱疹ウイルス感染症，ホジキン病，エイズ感染症，ヒトパピローマウイルス感染症，高カルシウム血症，高コレステロール血症，高グリセリド血症，高脂血症，感染症，インフルエンザ感染症，インシュリン依存性糖尿病（I型），侵襲性ブドウ球菌感染症，悪性黒色腫，がん転移，多発性骨髄腫，アレルギー性鼻炎，腎炎，非ホジキン性リンパ腫，インシュリン非依存性糖尿病（II型），非小細胞肺癌，臓器移植，骨関節炎，骨軟化症，骨減少症，骨粗鬆症，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺癌，脊髄損傷，胃がん，全身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，心弁膜症，血管性／多発梗塞痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

#### 【0080】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全



で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0081】

(8b) 本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

#### 【0082】

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ

、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

【0083】

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症

，卵巣がん，骨ペーチェット病，消化性潰瘍，末梢血管疾患，前立腺がん，逆流性食道炎，腎不全，リウマチ関節炎，精神分裂症，敗血症，敗血症ショック，重症全身性真菌感染症，小細胞肺癌，脊髄損傷，胃がん，全身性エリテマトーサス，一過性脳虚血発作，結核，心弁膜症，血管性／多発梗塞痴呆，創傷治癒，不眠症，関節炎，下垂体ホルモン分泌不全，瀕尿，尿毒症，または神経変成疾患等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

#### 【0084】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ま

しくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明の DNA に対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明の DNA 発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有する DNA を使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本発明のポリペプチドおよび部分ペプチドに対する受容体は次のようにして同定することができる。生理活性ペプチドの受容体の多くは 7 回膜貫通型受容体であり、現在リガンドが未知の多くのオーファン受容体が報告されている。従って、これらのオーファン受容体を CHO 細胞や HEK293 細胞など適当な細胞に発現させてそれらに本発明のポリペプチドおよび部分ペプチドを加えて、特異的なシグナル伝達を誘導するような細胞刺激活性を有するかどうかを調べることにより特異的な受容体を同定することができる。またゲノムあるいは cDNA ライブラリーを適当な動物細胞に導入してそれにラジオアイソトープを標識した本発明のポリペプチドあるいは部分ペプチドを加えてその結合を調べることにより、受容体をコードする遺伝子を単離することができる。

さらに本発明は、生理活性ペプチドをコードする遺伝子はしばしばペプチドの配列モチーフが繰り返されるという特徴を利用して、未知の生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩を同定する方法、および該方法によって得られた生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩なども提供する。

生理活性ペプチドの有する配列モチーフとして、具体的には、例えば R F amide、R S amide、または R L amide 構造を有する本発明のポリペプチドの特徴的な配列である RFG(R/K) 配列または RSG(R/K) 配列または RLG(R/K) 配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列などがあげられる。このような短いアミノ酸配列をコードしうる DNA 配列は生理活性ペプチドの DNA 配列以外でも偶然的にかなりの頻度で出現してくるが、このような配列が繰り返していることを特徴とする配列を探すことによりより高い確率で生理活性ペプチドをコードする DNA を見出すことができる。

より具体的には、RFG(R/K) 配列または RSG(R/K) 配列または RLG(K/R) 配列または該アミノ酸配列を含有する配列およびそれをコードする塩基配列を含有する配列をプローブとしてデータベースの検索をすることにより目的とする遺伝子を取得することができる。該プローブとしては、例えば、ペプチドの配列として RFG(K/R)、RSG(K/R)、RLG(K/R) に対応する DNA の配列として、

RFGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 2 0)

RFGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 1)

RSGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 2 2)

RSGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 3)

RLGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 2 4)

RLGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 2 5) などがあげられる。

さらに、該配列モチーフを用いてcDNAあるいはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより目的とする遺伝子を取得することもできる。またジーントラッパーのように上記プローブを使って目的の遺伝子のmRNAを精製し、そのmRNAからcDNAを取得することもできる。さらに他の配列モチーフ（繰り返して遺伝子にコードされているアミノ酸配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列など）を用いてRFamide、RSamideまたはRLamide構造以外の生理活性ペプチドの同定にも使うことができる。

さらにRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドはペプチドのC末端側にRFamide、RSamideまたはRLamide構造の共通構造を有しているので、RFamide、RSamideまたはRLamide構造を含む抗体を使って、未知のRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドを探索することが可能である。また、RFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドの受容体の多くは7回膜貫通型受容体である。従って、抗RFamide抗体、抗RSamide抗体または抗RLamide抗体を使って濃縮あるいは分画した動物組織抽出物をリガンドが決定していないオーファン受容体発現細胞に加えて、そのシグナル伝達を調べることにより、オーファン受容体のリガンドを決定することができる。

RFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチド以外にも共通配列を有するペプチドは数多く存在するので、この方法はRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチド以外のペプチドにも使うことができる。

#### 【0085】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン

G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
K	: グアニン (G) またはチミン (T)
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
W	: アデニン (A) またはチミン (T)
B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)
N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしく は チミン (T) または不明もしくは他の塩基

【0086】

RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
BHA	: ベンズヒドリルアミン
pMBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
Tos	: p-トルエンスルフォニル
Bzl	: ベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル



Boc : t-ブチルオキシカルボニル  
 DCM : ジクロロメタン  
 HOBT : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
 DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
 TFA : トリフルオロ酢酸  
 DIEA : ジイソプロピルエチルアミン

【0087】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸

【0 0 8 8】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

後述の実施例 1 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー F 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー R 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

後述の実施例 3 で用いられるプライマー h R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の実施例 3 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 0〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 1〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b F 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 2〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b R 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 3〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b R 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 4〕

後述の実施例 4 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ウシ型）を示す。

〔配列番号：1 5〕

配列番号：1 4 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 6〕

後述の実施例 5 で用いられるプライマー r L P R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 7〕

後述の実施例 5 で用いられるプライマー r L P F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：1 8〕

後述の実施例 5 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング前）。

〔配列番号：1 9〕

配列番号：1 8 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：2 0〕

R F G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：2 1〕

R F G R 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：2 2〕

R S G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：2 3〕

R S G R 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：2 4〕

R L G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

R L G R 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

後述の実施例6で用いられるプライマーFF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

後述の実施例6で用いられるプライマーrR4の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmoFの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の実施例6で用いられるプライマーmoRの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

後述の実施例6で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（マウス型）を示す。

〔配列番号：34〕

配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

後述の実施例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使

用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

後述の実施例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T022L のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

後述の実施例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T022L をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

後述の実施例 7 (3) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：40〕

後述の実施例 7 (4) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：41〕

後述の実施例 7 (5) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 81 番目 (Met) ～第 92 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 101 番目 (Ser) ～112 番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 124 番目 (Val) ～131 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 番目 (Met) ～第 92 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の、第 1 番目 (Met) ～112 番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の、第 1 番目 (Met) ～ 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：4 8〕

実施例 5 で用いられたプライマー ratF2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：4 9〕

実施例 5 で用いられたプライマー ratR の塩基配列を示す。

〔配列番号：5 0〕

後述の実施例 5 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列 (ラット型) を示す (リクローニング後)。

〔配列番号：5 1〕

配列番号：5 0 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：5 2〕

実施例 9 で用いられたプライマー bFF の塩基配列を示す。

〔配列番号：5 3〕

実施例 9 で用いられたプライマー bFR の塩基配列を示す。

【0 0 8 9】

後述の実施例 2 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF1 は、平成 1 1 年 4 月 1 4 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託番号 F E R M B P - 6 7 0 2 として、財団法人発酵研究所 (I F O) に 1999 年 3 月 5 日から寄託番号 I F O 1 6 2 6 5 として寄託されている。

後述の実施例 7 で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) D H 1 0 B / p A K - r O T 0 2 2 L は、平成 1 0 年 1 1 月 2 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託番号 F E R M B P - 6 5 5 8 として、平成 1 0 年 1 0 月 1 6 日から財団法人・発酵研究所 (I F O) に寄託番号 I F O 1 6 2 1 1 として寄託されている。

後述の実施例 9 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p bRF2 は、平成 1 1 年 8 月 2 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託番号 F E R M B P - 6 8 1 1 として、財団法人発酵研究所 (I F O

）に1999年6月18日から寄託番号 IF016288として寄託されている。

後述の実施例8で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF2 は、平成11年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号 FERM BP-6812として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号 IF016289として寄託されている。

後述の実施例6で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p mLP4 は、平成11年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号 FERM BP-6813として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号 IF016290として寄託されている。

後述の実施例5で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p rLPL6 は、平成11年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号 FERM BP-6814として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年6月18日から寄託番号 IF016291として寄託されている。

【0090】

#### 【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0091】

実施例1 ヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

クローンテック社より購入したヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分1μgにプライマーとしてOligod Tプライマー（GibcoBRL社）を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（GibcoBRL社）により、添付バッファーを用いてcDNAを合成した。反応後の産物はフェノール：クロロホルム（1：1）で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30μlのTEに溶解した。調製したcDNA 1μlを鋳型として、次の2つのプライマー（F5およびF6）を用いて、PCRによる増幅を行った。

F5 : 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' （配列番号：3）

F 6 : 5'-CTAGACCACCTCTATATAACTGCCCAT-3' (配列番号 : 4)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F 5およびF 6) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 μlおよび酵素に付属のバッファー5 μlで、総反応溶液量は50 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー) を用い98℃・10秒、63℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。

さらにそのPCR産物の1 μlを鋳型として次の2つのプライマー (F 1およびR 5) を用いて、nested PCRによる増幅を行った。

F 1 : 5'-GCACATAGAGACTTAATTTTAGATTTAGAC-3' (配列番号 : 5)

R 5 : 5'-CATGCACTTTGACTGGTTTCCAGGTAT-3' (配列番号 : 6)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F 1およびR 5) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 μlおよび酵素に付属のバッファー5 μlで、総反応溶液量は50 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

# 【0092】

実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

実施例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝(株)) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p hRF1を得た。



個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。決定した塩基配列を〔図1〕に示した。

決定した塩基配列を〔図1〕をもとにホモロジー検索と配列の解析を行った結果、形質転換体E.coli JM109/p hRF1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。

【0093】

実施例3 ヒト胎児脳cDNAからの生理活性ペプチドcDNAのスプライシングバリエーションの取得

実施例1で作製したヒト胎児脳cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライマー（F5、hR1）を用いてPCRによる増幅を行った。

F5: 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3'（配列番号：3）

hR1: 5'-CAGCTTTAGGGACAGGCTCCAGGTTTC-3'（配列番号：7）

反応液の組成は合成プライマー（F5およびhR1）各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit（Quiagen）を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBigDye Deoxy Terminatoe Cycle Sequence Kit（ABI）を用いて行い、蛍光式自動Sequencer（ABI377）を用いて解読した。得られた塩基配列の情報解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング）を用いて行った。その結果、実施例2で得

られたcDNAと3'末端側が異なるcDNAが得られた。したがって本実施例で得られたcDNAは、実施例2で得られたcDNAのスプライシングバリエーションである事が分かった。決定した塩基配列（配列番号：9）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：8）を〔図3〕に示す。

【0094】

#### 実施例4 ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからのウシ型生理活性ペプチドcDNAの取得はMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製した牛視床下部cDNAを鋳型として、次の4つのプライマー（bF6、bF7、bR6、bR7）を合成し、Kit添付のAP1、AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

bF6:5'-GCCTAGAGGAGATCTAGGCTGGGAGGA-3'（配列番号：10）

bF7:5'-GGGAGGAACATGGAAGAAGAAAGGAGC-3'（配列番号：11）

bR6:5'-GATGGTGAATGCATGGACTGCTGGAGC-3'（配列番号：12）

bR7:5'-TTCCTCCCAAATCTCAGTGGCAGGTTG-3'（配列番号：13）

5'側（N末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー（bR6とAP1）を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃10秒、72℃2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bR7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。

3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー（bF6とAP1）を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃10秒、72℃2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。

ase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bF7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBig Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。

得られた塩基配列の情報解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング）を用いて行った。決定した塩基配列（配列番号：15）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：14）を〔図4〕に示す。

【0095】

実施例5 ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのラット型生理活性ペプチドcDNAの取得はMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製したラット脳cDNAを鋳型として、次の2つのプライマー

rLPR1: 5'-CCCTGGGGCTTCTTCTGTCTTCTATGT-3' (配列番号: 16)

rLPF1: 5'-AGCGATTCATTTTATTGACTTTAGCA-3' (配列番号: 17)

を合成し、Kit添付のAP1, AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

5'側（N末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq DNA

polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして一回目のプライマーセット、同様の反応液組成にて二回目のPCRを行った。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、（68℃・2分30秒）のサイクルを38回くりかえした。

3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPF1とAP1のプライマーセットを用いて行った。反応液組成は5'側（N末領域）の増幅の場合と同様とした。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃20秒、72℃2分のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にしてrLPF1とAP2プライマーにて二回目のPCRを行った。反応液組成は一回目のPCRと同様とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・2分のサイクルを38回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物バンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は実施例3と同様の方法で行った。決定した塩基配列（配列番号：19）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：18）を〔図5〕に示す。さらにこの配列をもとに、開始コドンと終止コドンの周辺に2本のプライマー

ratF2: 5'-AATGGAAATTATTTTCATCAAAGCGATTCAT-3'（配列番号：48）

ratR: 5'-CACCTATACTGACAGGAATGATGGCTCTCC-3'（配列番号：49）

を合成した。ラット視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAよりAMV reverse transferase（宝酒造）とrandom 9 mer（宝酒造）を用いて合成したcDNAを鋳型として98℃・10秒、68℃・40秒のサイクルを33回くりかえすPCR反応を行った。さらにこの反応液を鋳型として98℃・10秒、68℃・1分のサイクルを38回くりかえすPCR

反応を行い、約690 b p のPCR産物を得た。これをTA cloning Kit (Invitrogen) のマニュアルにしたがってクローニングベクターpCR2.1 TOPO へ導入、大腸菌 J M 1 0 9 に導入して形質転換体 E. coli JM109/prLPL6を得た。実施例 3 と同様の方法で塩基配列を決定し（配列番号：5 1）、アミノ酸配列（配列番号：5 0）を予測した。

【 0 0 9 6 】

実施例 6 マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのMarathon PCR法によるマウス型生理活性ペプチドcDNAの取得と配列確認

マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからマウス型生理活性ペプチドcDNAを取得するため、まずマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μg をoligo d(T) primer 2.5 pmol(宝酒造)、0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT存在下で、SuperScriptII RNase H- 逆転写酵素 (GIBCO BRL) により、4 2℃、1時間の反応で c DNAを合成した。これを鋳型として、プライマ

FF2: 5'-GACTTAATTTTAGATTAGACAAAATGGAA-3' (配列番号: 2 6)

rR4: 5'-TTCTCCCAAACCTTTGGGGCAGGTT-3' (配列番号: 2 7)

および、KlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを39回くりかえすPCR反応を行った。さらに同じプライマーセットを用いて98℃ 10秒、6 0℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを2 5回くりかえすPCR反応を行い、増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出して、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、実施例3と同様の方法で塩基配列を決定した。得られたマウス型生理活性ペプチド c DNA断片の5' および3' 側の配列を取得するため、実施例5と同様に、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いてマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μg から c DNAを合成し、鋳型とした。次の3つのプライマー

mF1: 5'-ACAGCAAAGAAGGTGACGGAATACTC-3' (配列番号: 2 8)

mF3: 5'-ATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGAGCAC-3' (配列番号: 2 9)

mR1: 5'-GTGCTGCGGGGCTTCTTTTCTCATCTAT-3' (配列番号: 3 0)

を合成し、kit付属のAP1プライマーと組み合わせてPCRを行った。

5' 側 (N末領域) の増幅のために、まず一回目のPCR反応をmR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。3' 側 (C末領域) の増幅のためには、一回目のPCR反応をmF1とAP1のプライマーセットで行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25 mlとした。増幅のためのサイクルは98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして二回目のPCRを行った。5' 側の増幅は一回目と同様のプライマーセット、3' 側の増幅はmF3とAP1プライマーセットを用い、一回目のPCRと同様の反応液組成で反応液を調製した。PCR反応は98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを38回くりかえした。

5' 側、3' 側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物のバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は実施例3と同様の方法で行った。

さらに得られた配列をもとに2つのプライマー

mof: 5'-TTTAGACTTAGACGAAATGGA-3' (配列番号: 31)

mor: 5'-GCTCCGTAGCCTCTTGAAGTC-3' (配列番号: 32)

を合成し、先に示した、マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAよりSuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素で合成したcDNAを鋳型としてPCRを行い、マウス型生理活性ペプチド全長cDNAを含む断片を増幅した。反応はKlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 15秒のサイクルを35回くりかえした。約600bpの増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出し、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、クローニングベクター pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit、Invitrogen)へサブクローニング、大腸菌JM109へ導入し、形質転換体E. coli JM109/ pMLP4を得た。実施例3と同様の方法で塩基配列を解析し、決定した塩基配列 (配列番号: 34) と予測されるアミノ酸配列 (配列番号: 33) を図7に示す。

【0097】

実施例 7

(1) ラット脳幹周辺部の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定

ラット脳幹周辺部 cDNA を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー 1 (配列番号: 35) およびプライマー 2 (配列番号: 36) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA の 10 分の 1 量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTech 社) 1/50 量、プライマー 1 (配列番号: 35) およびプライマー 2 (配列番号: 36) を各 0.2  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、① 94℃・2 分の後、② 94℃・30 秒、72℃・2 分のサイクルを 3 回、③ 94℃・30 秒、68℃・2 分のサイクルを 3 回、④ 94℃・30 秒、64℃・30 秒、68℃ 2 分のサイクルを 30 回繰り返し、⑤ 最後に 68℃・8 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応後の反応産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen 社) へサブクローニングした。これを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、cDNA をもつクローンをアンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 38) を得た。この cDNA より導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 37) を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を rOT7T022L と命名した。

本発明のラット脳幹周辺部由来の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T022L をコードする cDNA (配列番号: 38) がサブクローニングされたプラスミド pAK-rOT022L を、自体公知の方法に従い大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B に導入して、形質転換体: 大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pAK-rOT022L を得た。

【0098】

(2) G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 rOT7T022L 発現 CHO 細胞の樹

立

直径 10 cm の組織培養用シャーレに  $1 \times 10^6$  個の CHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種し、24 時間培養した。(1) で得られた rOT7T022L 発現ベクター pAK-rOT022L を  $20 \mu\text{g}$  用い、リポソーム法による遺伝子導入キット (ジーントランスファー、ニッポンジーン社) を用いて、DNA・リポソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交換し、これに DNA・リポソームの複合体を添加して一晩インキュベートした。培地を新鮮なものに交換してさらに 1 日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換して 2 日間培養した。さらに、トリプシン-EDTA 処理によってシャーレ内の細胞を回収し、細胞密度が希薄な状態にて再培養を行うことによって、形質転換体の割合の増加を図った。これにより、rOT7T022L を安定に高発現する細胞株 CHO-rOT7T022L のクローンを得た。

【0099】

(3) Met-Pro-His-Ser-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 39) の合成

市販 p-メチル BHA 樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.5 mmole 分をペプチド合成機 (アプライド バイオシテムズ社製 430A) の反応器に入れ、DCM で膨潤させた後、最初のアミノ酸 Boc-Phe を HOBt/DCC 法で活性化し p-メチル BHA 樹脂に導入した。樹脂を 50% TFA/DCM で処理し、Boc 基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEA で中和した。このアミノ基に次のアミノ酸 Boc-Arg(Tos) を HOBt/DCC 法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Leu、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asn、Boc-Ala、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Pro、Boc-Met を順次縮合した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を 50% TFA/DCM で処理し樹脂上の Boc 基を除去後、樹脂を乾燥し Met-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.73g を得た。

この樹脂 0.25g を p-クレゾール 5.1g、弗化水素 15ml と共にテフロン製弗化水素反応装置中で 0℃ 60 分間反応した。弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル 100ml を加え攪拌後、グラスフィルター上に濾取、乾燥した。



これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25 (2 x 90 cm) のカラムに付し50%酢酸水で展開し主要画分を集め凍結乾燥した。次にこの粗精製ペプチドを5%チオグリコール酸/50%酢酸1.5mlに溶解し、50℃ 12時間保持しMet酸化体ペプチドを還元した後、LiChroprep (商品名) RP-18 (MERCK社製) を充填した逆相系カラムにつけ0.1% TFA水と0.1% TFA含有33%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度27%前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末26mgを得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  1428.7 (理論値 1428.8)

HPLC溶出時間 18.0分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0100】

(4) Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 40) の合成

上述の実施例7(3)と同様にして、Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Valを順次縮合し、Boc-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.43gを得た。この樹脂0.22gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物46mgを得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  969.5 (理論値 969.6)

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

【0101】

(5) Ser-Ala-Gly-Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Arg-Ser-NH<sub>2</sub> (配列番号：41) の合成

上述の実施例7(3)と同様にして、Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl)を順次縮合し、Boc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-pMBHA-resin 0.62gを得た。この樹脂0.23gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物71mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1156.4 (理論値 1156.6)

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム： Wakosil (商品名) 5C18 (4.6×100mm)

溶離液： A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

【0102】

(6) r0T7T022L (配列番号：37) とペプチドMPHSFANLP LRFamide (配列番号：39) およびペプチドVPNLPQR Famide (配列番号：40) のサイトセンサーによる反応実験

上述の実施例7(2)で得られたr0T7T022L受容体発現CHO細胞を、 $2.7 \times 10^5$  cells/capsuleの密度でサイトセンサー用カプセルに播種し、一晚培養した後、サイトにセンサーのワークステーションに装着した。サイトにセンサーの流路にセットしたアッセイ用の培地 (0.1%のウシ血清アルブミンを含有するlow buffered RPMI1640 medium) を、ポンプON (80秒間) ポンプOFF (40秒間) のサイクルで細胞に供給し、各サイクルごとにポンプ停止8秒後から30秒間の細胞外pHの変化率をacidification rateとして算出した。acidification rateの経時変化をモニターし、安定した値を示すようになったところで流路の切り換えによっ

て細胞に各ペプチドを7分2秒間暴露した。各ウェルのAcidification Rateの値をペプチドを暴露する直前の3サイクルの値を100%として標準化し、細胞の反応の比較を行なったところ、r0T7T022L発現CHO細胞はペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）およびペプチドVPNLPQRFamide（配列番号：40）に対して強く用量依存的な反応を示す事が明らかになった（図8）。

## 【0103】

実施例8 ヒト新規生理活性ペプチド候補スプライシングバリエーションcDNAを保持する形質転換体の作成

上記実施例3で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell（宝酒造）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）JM109/p h R F2を得た。

## 【0104】

実施例9 ウシ新規生理活性ペプチドcDNAを保持する形質転換体の作成

実施例4で作製したウシ視床下部cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライマー（bFF、bFR）を用いてPCRによる増幅を行った。

bFF:5' -TTCTAGATTTTGGACAAAATGGAAATT-3' (配列番号: 5 2)

bFR:5' -CGTCTTTAGGGACAGGCTCCAGATTTC-3' (配列番号: 5 3)

反応液の組成は合成プライマー (bFFおよびbFR) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex T aq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。実施例3で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター pCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAを用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。さらに調製したDNAをRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pbRF2を得た。

【0105】

#### 【発明の効果】

本発明のポリペプチドなどは、例えば、神経細胞刺激活性などを有するため、神経疾患治療薬などとして使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる

化合物は神経疾患の予防・治療剤として期待される。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量などに使用することができる。

【0 1 0 6】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> A99150

<150> JP 11-060030

<151> 1999-03-08

<150> JP 11-106812

<151> 1999-04-14

<160> 47

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1                      5                      10                      15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met

20                      25                      30

Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35                      40                      45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp

50                      55                      60

Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys

65                      70                      75                      80

特平 1 1 - 2 2 1 6 4 0

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val  
85 90 95  
Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser  
100 105 110  
Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro  
115 120 125  
Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu  
130 135 140  
Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu  
145 150 155 160  
Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln  
165 170 175  
Lys Gln Ser Arg  
180

<210> 2

<211> 540

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGGA AATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
ACATCAAAACA TTTTGTGTC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAAT 120  
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
GAATTAAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAAA 240  
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300  
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGA AGAAATATGGA GGTGAGCCTC 360  
GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC 420  
TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA 480  
TTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG 540

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 3

GGGCTGCACA TAGAGACTTA ATTTTAG

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

CTAGACCACC TCTATATAAC TGCCCAT

27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GCACATAGAG ACTTAATTTT AGATTTAGAC

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

CATGCACTTT GACTGGTTTC CAGGTAT

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CAGCTTTAGG GACAGGCTCC AGGTTTC

27

<210> 8

<211> 196

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met

20 25 30

Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35 40 45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp

50 55 60

Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys

65 70 75 80

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val

85 90 95

Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser

100 105 110



特平 1 1 - 2 2 1 6 4 0

Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro

115

120

125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

130

135

140

Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu

145

150

155

160

Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln

165

170

175

Lys Gln Ser Arg Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu

180

185

190

Lys Gln Glu Lys

195

<210> 9

<211> 588

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA	60
ACATCAAAACA TTTTGTGTC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT	120
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG	180
GAATTAAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA	240
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA	300
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGAA GAAATATGGA GGTGAGCCTC	360
GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC	420
TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA	480
TTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG	540
AGACTGCTAT TCAAGAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA	588

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GCCTAGAGGA GATCTAGGCT GGGAGGA

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

GGGAGGAACA TGGAAGAAGA AAGGAGC

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

GATGGTGAAT GCATGGACTG CTGGAGC

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

TTCCTCCCAA ATCTCAGTGG CAGGTTG

27

<210> 14

<211> 196

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 14

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met

20 25 30

Pro Asn Leu Tyr Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35 40 45

Gly Asp Leu Gly Trp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val

50 55 60

Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys

65 70 75 80

Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Met

85 90 95

Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu

100 105 110

Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro

115 120 125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu

130 135 140

Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu

145 150 155 160

Leu Tyr Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln

165 170 175

Lys Asn Leu Arg Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu

180 185 190

Lys Gln Glu Lys

195

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

ATGGAAATTA TTTCATTAAA ACGATTCATT TTATTGATGT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60

ACATCAAACA TCTTCTGCAC AGACGAATCA AGGATGCCCA ATCTTTACAG CAAAAAGAAT 120

TATGACAAAT ATTCCGAGCC TAGAGGAGAT CTAGGCTGGG AGAAAGAAAG AAGTCTTACT 180

TTTGAAGAAG TAAAAGATTG GGCTCCAAAA ATTAAGATGA ATAAACCTGT AGTCAACAAA 240

ATGCCACCTT CTGCAGCCAA CCTGCCACTG AGATTTGGGA GGAACATGGA AGAAGAAAGG 300

AGCACTAGGG CGATGGCCCA CCTGCCTCTG AGACTCGGAA AAAATAGAGA GGACAGCCTC 360

TCCAGATGGG TCCCAAATCT GCCCCAGAGG TTTGGAAGAA CAACAACAGC CAAAAGCATT 420

ACCAAGACCC TGAGTAATTT GCTCCAGCAG TCCATGCATT CACCATCTAC CAATGGGCTA 480

CTCTACTCCA TGGCCTGCCA GCCCCAAGAA ATCCAGAATC CTGGTCAAAA GAACCTAAGG 540

AGACGGGGAT TCCAGAAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA 588

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 16

CCCTGGGGCT TCTTCTGTCT TCTATGT

27

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 17

AGCGATTCAT TTTATTGACT TTAGCA

26

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

<213> Rat

<400> 18

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala

100 105 110

特平 1 1 — 2 2 1 6 4 0

Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
 115 120 125  
 Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
 130 135 140  
 Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
 145 150 155 160  
 His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
 165 170 175  
 Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn  
 180 185 190  
 Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu  
 195 200

<210> 19

<211> 609

<212> DNA

<213> Rat

<400> 19

ATGGAAATTA TTTCATCAAA GCGATTCATT TTATTGACTT TAGCAACTTC AAGCTTCTTA 60  
 ACTTCAAACA CCCTTTGTTC AGATGAATTA ATGATGCCCC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120  
 TATGGAAAAT ATTACCAGCT GAGAGGAATC CAAAAGGGG TAAAGGAAAG AAGTGTCAC 180  
 TTTCAAGAAC TCAAAGATTG GGGGGCAAAG AAAGATATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240  
 AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTT CCCCTGAGGT TTGGGAGGAA CATAGAAGAC 300  
 AGAAGAAGCC CCAGGGCAGG GGCCAACATG GAGGCAGGGA CCATGAGCCA TTTTCCCAGC 360  
 CTGCCCCAAA GGT TTGGGAG AACAAACAGCC AGACGCATCA CCAAGACACT GGCTGGTTTG 420  
 CCCCAGAAAT CCCTGCACTC CCTGGCCTCC AGTGAATCGC TCTATGCCAT GACCCGCCAG 480  
 CATCAAGAAA TTCAGAGTCC TGGTCAAGAG CAACCTAGGA AACGGGTGTT CACGGAAACA 540  
 GATGATGCAG AAAGGAAACA AGAAAAAATA GGAAACCTCC AGCCAGTCCT TCAAGGGGCT 600  
 ATGAAGCTG 609

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 20

MGNTTYGGNA AR

12

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 21

MGNTTYGGNM GN

12

<210> 22

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 22

MGNWSNGGNA AR

12

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

MGNWSNGGNM GN

12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

MGNYTNGGNA AR

12

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 25

MGNYTNGGNM GN

12

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 26

GACTTAATTT TAGATTTAGA CAAAATGGAA

30

<210> 27

<211> 25

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 27

TTCTCCCAAA CCTTTGGGGC AGGTT

25

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 28

ACAGCAAAGA AGGTGACGGA AAATACTC

28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 29

ATAGATGAGA AAAGAAGCCC CGCAGCAC

28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 30

GTGCTGCGGG GCTTCTTTTC TCATCTAT

28

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 31

TTTAGACTTA GACGAAATGG A

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

GCTCCGTAGC CTCTTGAAGT C

21

<210> 33

<211> 188

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 33

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Val Ala Thr

1

5

10

15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Phe Cys Thr Asp Glu Phe Met Met

20

25

30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Asp Gly Lys Tyr Ser Gln Leu Arg

35

40

45

Gly Ile Pro Lys Gly Glu Lys Glu Arg Ser Val Ser Phe Gln Glu Leu

50

55

60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
                     85                      90                      95  
 Thr Ile Asp Glu Lys Arg Ser Pro Ala Ala Arg Val Asn Met Glu Ala  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Arg Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
                     115                      120                      125  
 Thr Ala Arg Ser Pro Lys Thr Pro Ala Asp Leu Pro Gln Lys Pro Leu  
                     130                      135                      140  
 His Ser Leu Gly Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Val Met Ile Cys Gln His  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gly Lys Arg Thr Arg Arg Gly Ala Phe  
                     165                      170                      175  
 Val Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Pro Glu Lys  
                     180                      185

<210> 34

<211> 564

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 34

ATGGAATTA TTTCATTAAA ACGATTCATT TTATTGACTG TGGCAACTTC AAGCTTCTTA 60  
 ACATCAAACA CCTTCTGTAC AGATGAGTTC ATGATGCCTC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120  
 GACGGAAAAT ACTCCCAGCT GAGAGGAATC CCAAAAGGGG AAAAGGAAAAG AAGTGTCACT 180  
 TTTCAAGAAC TAAAAGATTG GGGGGCAAAG AATGTTATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240  
 AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTG CCCCTGAGAT TTGGAAGGAC CATAGATGAG 300  
 AAAAGAAGCC CCGCAGCAGG GGTCAACATG GAGGCAGGGA CCAGGAGCCA TTTCCCAGC 360  
 CTGCCCCAAA GGTGTGGGAG AACAACAGCC AGAAGCCCCA AGACACCCGC TGATTTGCCA 420  
 CAGAAACCCC TGCACCTACT GGGCTCCAGC GAGTTGCTCT ACGTCATGAT CTGCCAGCAC 480

CAAGAAATTC AGAGTCCTGG TGGAAAGCGA ACGAGGAGAG GAGCGTTTGT GGAAACAGAT 540  
GATGCAGAAA GGAAACCAGA AAAA 564

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

AGTCGACAGT ATGGAGGCGG AGCCCTC 27

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 36

GACTAGTTCA AATGTTCCAG GCCGGGATG 29

<210> 37

<211> 432

<212> PRT

<213> Rat

<400> 37

Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro Leu Gly

5

10

15

Gln Asn Gly Ser Asp Val Glu Thr Ser Met Ala Thr Ser Leu Thr Phe

20

25

30

Ser Ser Tyr Tyr Gln His Ser Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Ala

35

40

45

Ala Tyr Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val  
50 55 60  
Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met Arg Thr Val Thr Asn Met  
65 70 75 80  
Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys  
85 90 95  
Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp  
100 105 110  
Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser  
115 120 125  
Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys  
130 135 140  
Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Phe  
145 150 155 160  
Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser  
165 170 175  
Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Leu Asp  
180 185 190  
Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro  
195 200 205  
Glu Lys Gly Met Arg Lys Val Tyr Thr Ala Val Leu Phe Ala His Ile  
210 215 220  
Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Val Arg Ile Ala  
225 230 235 240  
Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Arg Asp Thr Glu Glu Ala  
245 250 255  
Val Ala Glu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His  
260 265 270  
Met Leu Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu

特平 1 1 — 2 2 1 6 4 0

275	280	285
Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Leu Gln		
290	295	300
Leu His Leu Leu Ser Val Tyr Ala Phe Pro Leu Ala His Trp Leu Ala		
305	310	315
Phe Phe His Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu		
325	330	335
Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Gln Leu Cys Trp		
340	345	350
Pro Pro Trp Ala Ala His Lys Gln Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Asn Arg		
355	360	365
Leu Leu Arg Arg Arg Val Val Val Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly		
370	375	380
Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Val Pro Gly Pro Gly Arg		
385	390	395
Leu Pro Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His Gln Asp Gly Pro Gly Glu		
405	410	415
Gly Pro Gly Cys Asn His Met Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asn Ile		
420	425	430

<210> 38

<211> 1299

<212> DNA

<213> Rat

<400> 38

ATGGAGGCGG AGCCCTCCCA GCCTCCCAAC GGCAGCTGGC CCCTGGGTCA GAACGGGAGT	60
GATGTGGAGA CCAGCATGGC AACCAGCCTC ACCTTCTCCT CCTACTACCA AACTCCTCT	120
CCGGTGGCAG CCATGTTTAT CGCGGCCTAC GTGCTCATCT TCCTCCTCTG CATGGTGGGC	180
AACACCCTGG TCTGCTTCAT TGTGCTCAAG AACCAGCACA TGCGCACTGT CACCAACATG	240
TTTATCCTCA ACCTGGCCGT CAGCGACCTG CTGGTGGGCA TCTTCTGCAT GCCACAACC	300

CTTGTGGACA ACCTTATCAC TGGTTGGCCT TTTGACAACG CCACATGCAA GATGAGCGGC 360  
 TTGGTGCAGG GCATGTCCGT GTCTGCATCG GTTTTCACAC TGGTGGCCAT CGCTGTGGAA 420  
 AGGTTCCGCT GCATCGTGCA CCCTTTCCGC GAGAAGCTGA CCCTTCGGAA GGCGCTGTTC 480  
 ACCATCGCGG TGATCTGGGC TCTGGCGCTG CTCATCATGT GTCCCTCGGC GGTCACCTCTG 540  
 ACAGTCACCC GAGAGGAGCA TCACTTCATG CTGGATGCTC GTAACCGCTC CTACCCGCTC 600  
 TACTCGTGCT GGGAGGCCTG GCGCGAGAAG GGCATGCGCA AGGTCTACAC CGCGGTGCTC 660  
 TTCGCGCACA TCTACCTGGT GCGGCTGGCG CTCATCGTAG TGATGTACGT GCGCATCGCG 720  
 CGCAAGCTAT GCCAGGCCCC CGGTCCTGCG CGCGACACGG AGGAGGCGGT GGCCGAGGGT 780  
 GGCCGCACTT CGCGCCGTAG GGCCCGCTG GTGCACATGC TGGTCATGGT GGCGCTCTTC 840  
 TTCACGTTGT CCTGGCTGCC ACTCTGGGTG CTGCTGCTGC TCATCGACTA TGGGGAGCTG 900  
 AGCGAGCTGC AACTGCACCT GCTGTGCGTC TACGCCTTCC CCTTGGCACA CTGGCTGGCC 960  
 TTCTTCCACA GCAGCGCCAA CCCCATCATC TACGGCTACT TCAACGAGAA CTTCCGCCGC 1020  
 GGCTTCCAGG CTGCCTTCCG TGCACAGCTC TGCTGGCCTC CCTGGGCCGC CCACAAGCAA 1080  
 GCCTACTCGG AGCGGCCCAA CCGCCTCCTG CGCAGGCGGG TGGTGGTGGA CGTGCAACCC 1140  
 AGCGACTCCG GCCTGCCATC AGAGTCTGGC CCCAGCAGCG GGGTCCCAGG GCCTGGCCGG 1200  
 CTGCCACTGC GCAATGGGCG TGTGGCCCAT CAGGATGGCC CGGGGGAAGG GCCAGGCTGC 1260  
 AACCACATGC CCCTCACCAT CCCGGCCTGG AACATTGGA 1299

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 39

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

1

5

10

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

<400> 40

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

1

5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

<400> 41

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Arg Ser

1

5

10

<210> 42

<211> 36

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTT

36

<210> 43

<211> 36

<212> DNA

<213> Human

<400> 43

AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCT

36

<210> 44

<211> 24



<212> DNA

<213> Human

<400> 44

G TTCCTAACC TGCCCCAAAG GTTT

24

<210> 45

<211> 276

<212> DNA

<213> Human

<400> 45

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120  
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240  
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTT 276

<210> 46

<211> 336

<212> DNA

<213> Human

<400> 46

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
ACATCAAACA TTTTTTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120  
TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
GAATTAAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240  
ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300  
AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CTGCCTCTG AGATCT 336

<210> 47

<211> 393

<212> DNA

<213> Human

<400> 47

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60  
 ACATCAAACA TTTTGTGTGC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120  
 TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180  
 GAATTA AAAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240  
 ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTGCCCATTG AGATTTGGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300  
 AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGA AGAAATATGGA GGTGAGCCTC 360  
 GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTT 393

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 48

CCCTGGGGCT TCTTCTGTCT TCTATGT 27

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 49

AGCGATTCAT TTTATTGACT TTAGCA 26

<210> 50

<211> 203

<212> PRT

<213> Rat

<400> 50

特平 1 1 - 2 2 1 6 4 0

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met  
20 25 30  
Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg  
35 40 45  
Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu  
50 55 60  
Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
65 70 75 80  
Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
85 90 95  
Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala  
100 105 110  
Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
115 120 125  
Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
130 135 140  
Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
145 150 155 160  
His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
165 170 175  
Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn  
180 185 190  
Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu  
195 200

<210> 51

<211> 609

<212> DNA

<213> Rat

<400> 51

ATGGAATTA TTTCATCAAA GCGATTCATT TTATTGACTT TAGCAACTTC AAGCTTCTTA 60  
 ACTTCAAACA CCCTTTGTTC AGATGAATTA ATGATGCCCC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120  
 TATGGAAAAT ATTACCAGCT GAGAGGAATC CAAAAGGGG TAAAGGAAAG AAGTGTCAC 180  
 TTTCAAGAAC TCAAAGATTG GGGGGCAAAG AAAGATATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240  
 AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTT CCCCTGAGGT TTGGGAGGAA CATAGAAGAC 300  
 AGAAGAAGCC CCAGGGCAGC GGCCAACATG GAGGCAGGGA CCATGAGCCA TTTTCCCAGC 360  
 CTGCCCCAAA GGTTTGGGAG AACAAACAGC AGACGCATCA CCAAGACACT GGCTGGTTTG 420  
 CCCAGAAAAT CCCTGCACTC CCTGGCCTCC AGTGAATTGC TCTATGCCAT GACCCGCCAG 480  
 CATCAAGAAA TTCAGAGTCC TGGTCAAGAG CAACCTAGGA AACGGGTGTT CACGGAAACA 540  
 GATGATGCAG AAAGGAAACA AGAAAAATA GGAAACCTCC AGCCAGTCCT TCAAGGGGCT 600  
 ATGAAGCTG 609

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 52

TTCTAGATT TGGACAAAAT GGAAATT 27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 52

CGTCTTTAGG GACAGGCTCC AGATTTC 27

【 0 1 0 7 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）をコードする DNA の塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図 2】 本発明のポリペプチドの疎水性プロットを示す図を示す。

【図 3】 実施例 3 で得られた本発明のポリペプチド（ヒト型）をコードする DNA の塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図 4】 実施例 4 で得られた本発明のポリペプチド（ウシ型）をコードする DNA の塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図 5】 実施例 5 で得られた本発明のポリペプチド（ラット型）をコードする DNA の塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図 6】 実施例 3、4、5 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の比較を示す。

【図 7】 実施例 6 で得られた本発明のポリペプチド（マウス型）のアミノ酸配列および該ポリペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

【図 8】 実施例 7 で行われたサイトセンサーによる r0T7T022L 受容体発現 CHO 細胞に対するペプチドの反応性を示す図を示す。図中、●-●は MP H S F A N L P L R F a m i d e（配列番号：39）、△-△は V P N L P Q R F a m i d e（配列番号：40）を示す。

【書類名】 図面

【図1】

```

          9          18          27          36          45          54
5'  ATG  GAA  ATT  ATT  TCA  TCA  AAA  CTA  TTC  ATT  TTA  TTG  ACT  TTA  GCC  ACT  TCA  AGC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Met  Glu  Ile  Ile  Ser  Ser  Lys  Leu  Phe  Ile  Leu  Leu  Thr  Leu  Ala  Thr  Ser  Ser

          63          72          81          90          99          108
    TTG  TTA  ACA  TCA  AAC  ATT  TTT  TGT  GCA  GAT  GAA  TTA  GTG  ATG  TCC  AAT  CTT  CAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Leu  Leu  Thr  Ser  Asn  Ile  Phe  Cys  Ala  Asp  Glu  Leu  Val  Met  Ser  Asn  Leu  His

          117          126          135          144          153          162
    AGC  AAA  GAA  AAT  TAT  CAC  AAA  TAT  TCT  GAG  CCT  AGA  GGA  TAC  CCA  AAA  GGG  GAA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Lys  Glu  Asn  Tyr  Asp  Lys  Tyr  Ser  Glu  Pro  Arg  Gly  Tyr  Pro  Lys  Gly  Glu

          171          180          189          198          207          216
    AGA  AGC  CTC  AAT  TTT  GAG  GAA  TTA  AAA  GAT  TGG  GGA  CCA  AAA  AAT  GTT  ATT  AAG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Arg  Ser  Leu  Asn  Phe  Glu  Glu  Leu  Lys  Asp  Trp  Gly  Pro  Lys  Asn  Val  Ile  Lys

          225          234          243          252          261          270
    ATG  AGT  ACA  CCT  GCA  GTC  AAT  AAA  ATG  CCA  CAC  TCC  TTC  GCC  AAC  TTG  CCA  TTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Met  Ser  Thr  Pro  Ala  Val  Asn  Lys  Met  Pro  His  Ser  Phe  Ala  Asn  Leu  Pro  Leu

          279          288          297          306          315          324
    AGA  TTT  GGG  AGG  AAC  GTT  CAA  GAA  GAA  AGA  AGT  GCT  GGA  GCA  ACA  GCC  AAC  CTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Arg  Phe  Gly  Arg  Asn  Val  Gln  Glu  Glu  Arg  Ser  Ala  Gly  Ala  Thr  Ala  Asn  Leu

          333          342          351          360          369          378
    CCT  CTG  AGA  TCT  GGA  AGA  AAT  ATG  GAG  GTG  AGC  CTC  GTG  AGA  CGT  GTT  CCT  AAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Pro  Leu  Arg  Ser  Gly  Arg  Asn  Met  Glu  Val  Ser  Leu  Val  Arg  Arg  Val  Pro  Asn

          387          396          405          414          423          432
    CTG  CCC  CAA  AGG  TTT  GGG  AGA  ACA  ACA  ACA  GCC  AAA  AGT  GTC  TGC  AGG  ATG  CTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Leu  Pro  Gln  Arg  Phe  Gly  Arg  Thr  Thr  Thr  Ala  Lys  Ser  Val  Cys  Arg  Met  Leu

          441          450          459          468          477          486
    AGT  GAT  TTG  TGT  CAA  GGA  TCC  ATG  CAT  TCA  CCA  TGT  GCC  AAT  GAC  TTA  TTT  TAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Asp  Leu  Cys  Gln  Gly  Ser  Met  His  Ser  Pro  Cys  Ala  Asn  Asp  Leu  Phe  Tyr

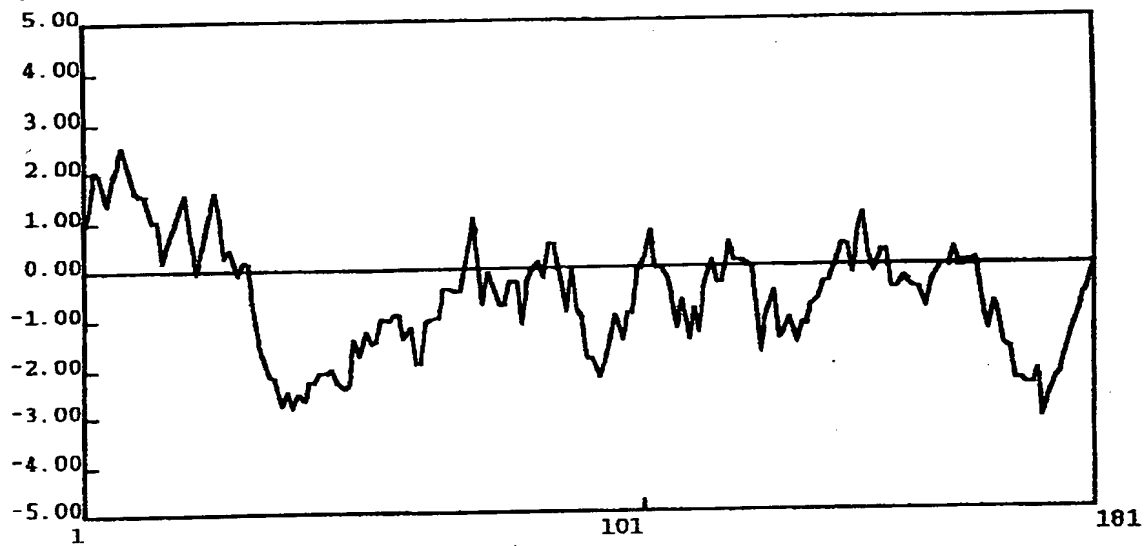
          495          504          513          522          531          540
    TCC  ATG  ACC  TGC  CAG  CAC  CAA  GAA  ATC  CAG  AAT  CCC  GAT  CAA  AAA  CAG  TCA  AGG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Ser  Met  Thr  Cys  Gln  His  Gln  Glu  Ile  Gln  Asn  Pro  Asp  Gln  Lys  Gln  Ser  Arg

TAA 3'
---
***

```

特平 1 1 - 2 2 1 6 4 0

【図 2】



【図 3】

5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TCA	AAA	CTA	TTC	ATT	TTA	TTG	ACT	TTA	GCC	ACT	TCA	AGC
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser
	TTG	TTA	ACA	TCA	AAC	ATT	TTT	TGT	GCA	GAT	GAA	TTA	GTG	ATG	TCC	AAT	CTT	CAC
	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Ala	Asp	Glu	Leu	Val	Met	Ser	Asn	Leu	His
	AGC	AAA	GAA	AAT	TAT	GAC	AAA	TAT	TCT	GAG	CCT	AGA	GGA	TAC	CCA	AAA	GGG	GAA
	Ser	Lys	Glu	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	Glu
	AGA	AGC	CTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TTA	AAA	GAT	TGG	GGA	CCA	AAA	AAT	GTT	ATT	AAG
	Arg	Ser	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Pro	Lys	Asn	Val	Ile	Lys
	ATG	AGT	ACA	CCT	GCA	GTC	AAT	AAA	ATG	CCA	CAC	TCC	TTC	GCC	AAC	TTG	CCA	TTG
	Met	Ser	Thr	Pro	Ala	Val	Asn	Lys	Met	Pro	His	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu
	AGA	TTT	GGG	AGG	AAC	GTT	CAA	GAA	GAA	AGA	AGT	GCT	GGA	GCA	ACA	GCC	AAC	CTG
	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Val	Gln	Glu	Glu	Arg	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Leu
	CCT	CTG	AGA	TCT	GGA	AGA	AAT	ATG	GAG	GTG	AGC	CTC	GTG	AGA	CGT	GTT	CCT	AAC
	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Val	Arg	Arg	Val	Pro	Asn
	CTG	CCC	CAA	AGG	TTT	GGG	AGA	ACA	ACA	ACA	GCC	AAA	AGT	GTC	TGC	AGG	ATG	CTG
	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Cys	Arg	Met	Leu
	AGT	GAT	TTG	TGT	CAA	GGA	TCC	ATG	CAT	TCA	CCA	TGT	GCC	AAT	GAC	TTA	TTT	TAC
	Ser	Asp	Leu	Cys	Gln	Gly	Ser	Met	His	Ser	Pro	Cys	Ala	Asn	Asp	Leu	Phe	Tyr
	TCC	ATG	ACC	TGC	CAG	CAC	CAA	GAA	ATC	CAG	AAT	CCC	GAT	CAA	AAA	CAG	TCA	AGG
	Ser	Met	Thr	Cys	Gln	His	Gln	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Gln	Ser	Arg
	AGA	CTG	CTA	TTC	AAG	AAA	ATA	GAT	GAT	GCA	GAA	TTG	AAA	CAA	GAA	AAA	TAA	3'
	Arg	Leu	Leu	Phe	Lys	Lys	Ile	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Gln	Glu	Lys	***	



【図 4】

		9		18		27		36		45		54						
5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TTA	AAA	CGA	TTC	ATT	TTA	TTG	ATG	TTA	GCC	ACT	TCA	AGC
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Phe	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser
		63		72		81		90		99		108						
	TTG	TTA	ACA	TCA	AAC	ATC	TTC	TGC	ACA	GAC	GAA	TCA	AGG	ATG	CCC	AAT	CTT	TAC
	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Thr	Asp	Glu	Ser	Arg	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr
		117		126		135		144		153		162						
	AGC	AAA	AAG	AAT	TAT	GAC	AAA	TAT	TCC	GAG	CCT	AGA	GGA	GAT	CTA	GGC	TGG	GAG
	Ser	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Asp	Leu	Gly	Trp	Glu
		171		180		189		198		207		216						
	AAA	GAA	AGA	AGT	CTT	ACT	TTT	GAA	GAA	GTA	AAA	GAT	TGG	GCT	CCA	AAA	ATT	AAG
	Lys	Glu	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Glu	Glu	Val	Lys	Asp	Trp	Ala	Pro	Lys	Ile	Lys
		225		234		243		252		261		270						
	ATG	AAT	AAA	CCT	GTA	GTC	AAC	AAA	ATG	CCA	CCT	TCT	GCA	GCC	AAC	CTG	CCA	CTG
	Met	Asn	Lys	Pro	Val	Val	Asn	Lys	Met	Pro	Pro	Ser	Ala	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu
		279		288		297		306		315		324						
	AGA	TTT	GGG	AGG	AAC	ATG	GAA	GAA	GAA	AGG	AGC	ACT	AGG	GCG	ATG	GCC	CAC	CTG
	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Ser	Thr	Arg	Ala	Met	Ala	His	Leu
		333		342		351		360		369		378						
	CCT	CTG	AGA	CTC	GGA	AAA	AAT	AGA	GAG	GAC	AGC	CTC	TCC	AGA	TGG	GTC	CCA	AAT
	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly	Lys	Asn	Arg	Glu	Asp	Ser	Leu	Ser	Arg	Trp	Val	Pro	Asn
		387		396		405		414		423		432						
	CTG	CCC	CAG	AGG	TTT	GGA	AGA	ACA	ACA	ACA	GCC	AAA	AGC	ATT	ACC	AAG	ACC	CTG
	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ser	Ile	Thr	Lys	Thr	Leu
		441		450		459		468		477		486						
	AGT	AAT	TTG	CTC	CAG	CAG	TCC	ATG	CAT	TCA	CCA	TCT	ACC	AAT	GGG	CTA	CTC	TAC
	Ser	Asn	Leu	Leu	Gln	Gln	Ser	Met	His	Ser	Pro	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Tyr
		495		504		513		522		531		540						
	TCC	ATG	GCC	TGC	CAG	CCC	CAA	GAA	ATC	CAG	AAT	CCT	GGT	CAA	AAG	AAC	CTA	AGG
	Ser	Met	Ala	Cys	Gln	Pro	Gln	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Lys	Asn	Leu	Arg
		549		558		567		576		585								
	AGA	CGG	GGA	TTC	CAG	AAA	ATA	GAT	GAT	GCA	GAA	TTG	AAA	CAA	GAA	AAA	TAA	3'
	Arg	Arg	Gly	Phe	Gln	Lys	Ile	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Gln	Glu	Lys	***	

【図 5】

5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TCA	AAG	CGA	TTC	ATT	TTA	TTG	ACT	TTA	GCA	ACT	TCA	AGC	
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Arg	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	
	TTC	TTA	ACT	TCA	AAC	ACC	CTT	TGT	TCA	GAT	GAA	TTA	ATG	ATG	CCC	CAT	TTT	CAC	
	Phe	Leu	Thr	Ser	Asn	Thr	Leu	Cys	Ser	Asp	Glu	Leu	Met	Met	Pro	His	Phe	His	
	AGC	AAA	GAA	GGT	TAT	GGA	AAA	TAT	TAC	CAG	CTG	AGA	GGA	ATC	CCA	AAA	GGG	GTA	
	Ser	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gln	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Lys	Gly	Val	
	AAG	GAA	AGA	AGT	GTC	ACT	TTT	CAA	GAA	CTC	AAA	GAT	TGG	GGG	GCA	AAG	AAA	GAT	
	Lys	Glu	Arg	Ser	Val	Thr	Phe	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Ala	Lys	Lys	Asp	
	ATT	AAG	ATG	AGT	CCA	GCC	CCT	GCC	AAC	AAA	GTG	CCC	CAC	TCA	GCA	GCC	AAC	CTT	
	Ile	Lys	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Lys	Val	Pro	His	Ser	Ala	Ala	Asn	Leu	
	CCC	CTG	AGG	TTT	GGG	AGG	AAC	ATA	GAA	GAC	AGA	AGA	AGC	CCC	AGG	GCA	CGG	GCC	
	Pro	Leu	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Ile	Glu	Asp	Arg	Arg	Ser	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	
	AAC	ATG	GAG	GCA	GGG	ACC	ATG	AGC	CAT	TTT	CCC	AGC	CTG	CCC	CAA	AGG	TTT	GGG	
	Asn	Met	Glu	Ala	Gly	Thr	Met	Ser	His	Phe	Pro	Ser	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	
	AGA	ACA	ACA	GCC	AGA	CGC	ATC	ACC	AAG	ACA	CTG	GCT	GGT	TTG	CCC	CAG	AAA	TCC	
	Arg	Thr	Thr	Ala	Arg	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Gln	Lys	Ser	
	CTG	CAC	TCC	CTG	GCC	TCC	AGT	GAA	TCG	CTC	TAT	GCC	ATG	ACC	CGC	CAG	CAT	CAA	
	Leu	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Thr	Arg	Gln	His	Gln	
	GAA	ATT	CAG	AGT	OCT	GGT	CAA	GAG	CAA	OCT	AGG	AAA	CGG	GTG	TTC	ACG	GAA	ACA	
	Glu	Ile	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Glu	Gln	Pro	Arg	Lys	Arg	Val	Phe	Thr	Glu	Thr	
	GAT	GAT	GCA	GAA	AGG	AAA	CAA	GAA	AAA	ATA	GGA	AAC	CTC	CAG	CCA	GTC	CTT	CAA	
	Asp	Asp	Ala	Glu	Arg	Lys	Gln	Glu	Lys	Ile	Gly	Asn	Leu	Gln	Pro	Val	Leu	Gln	
	GGG	GCT	ATG	AAG	CTG	TGA	3'												
	Gly	Ala	Met	Lys	Leu	***													

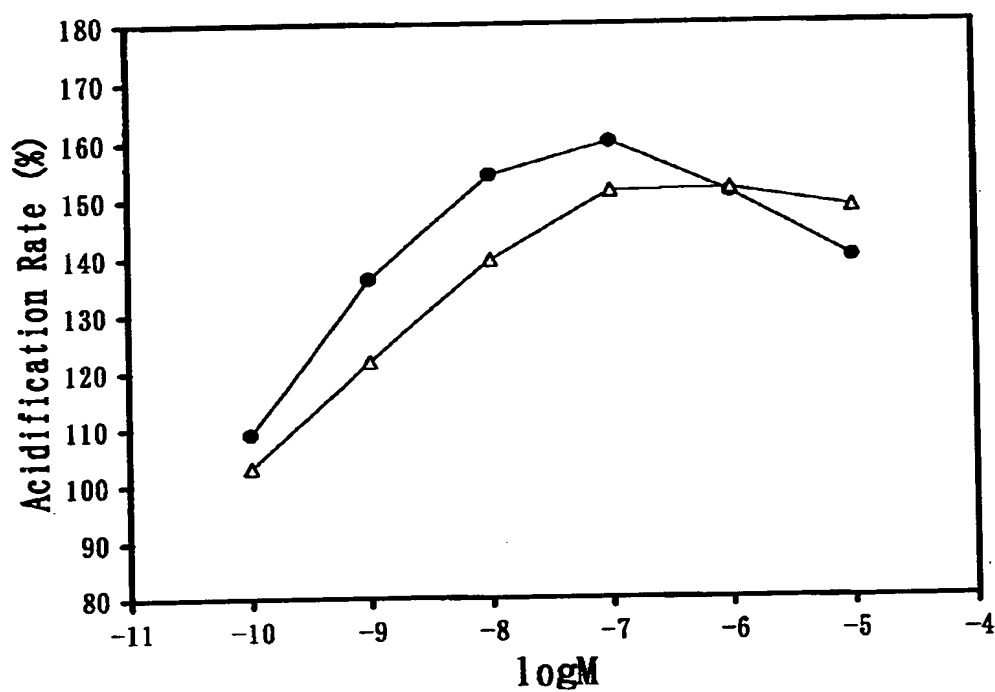
【図 6】

hLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSLL	TSNIFQDEL	VSNLHSEN	YDKYSEPRG	50
bLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSLL	TSNIFQDES	RPNLHSEN	YDKYSEPRGD	50
rLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSFL	TSNIFQDEL	MPHFHSKEG	YDKYQVLRGI	50
hLPLRF.aa	51	--YFKG--	ER	SUNFEELKDW	GPKNVIKMST	PANVKMPHSF	ANLPLRFGRN
bLPLRF.aa	51	LGWEK---	ER	SUTFEELKDW	APK--LKANK	PANVKMPHSA	ANLPLRFGRN
rLPLRF.aa	51	---FKGVNER	SUTFEELKDW	GPKKLIKMS	APANKMPHSA	ANLPLRFGRN	100
hLPLRF.aa	101	VOEERSAGAT	ANLPLRSGRN	MEMSLVRNP	NLPQRFGRIT	TAKSVCRMES	150
bLPLRF.aa	101	MEERSIRAM	ANLPLRLGN	RELSLVRNP	NLPQRFGRIT	TAKSVITKILS	150
rLPLRF.aa	101	EDRRSPRAR	ANM-----	EAGTMSHPE	SLPQRFGRIT	PRITTKTLA	150
hLPLRF.aa	151	DICQSMESH	CANDIYSMT	COHQEIQNP	OKQSRRLFK	KIDDAELKQE	200
bLPLRF.aa	151	NLIDQSMESH	STNGLLYSMA	COHQEIQNP	OKNLRRRGQ	KIDDAELKQE	200
rLPLRF.aa	151	GLPQKSHSL	ASSESLYMT	ROHQEIQSP	QEPFRKVEIT	ETDDAERKQE	200
hLPLRF.aa	201	K*	-----	-----	-----	-----	250
bLPLRF.aa	201	K*	-----	-----	-----	-----	250
rLPLRF.aa	201	KIGNLQFVLQ	GAMKL*	-----	-----	-----	250

【図 7】

1	TTTAGACTTAGACGAAATGGAAATTATTTTCATTAAAACGATTTCATTTTATTGACTGTG	58
1	MetGluIleIleSerLeuLysArgPheIleLeuLeuThrVal	14
59	GCAACTTCAAGCTTCTTAACATCAAACACCTTCTGTACAGATGAGTTCATGATGCCTCAT	118
15	AlaThrSerSerPheLeuThrSerAsnThrPheCysThrAspGluPheMetMetProHis	34
119	TTTCACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAATACTCCCAGCTGAGAGGAATCCCAAAGGGGAA	178
35	PheHisSerLysGluGlyAspGlyLysTyrSerGlnLeuArgGlyIleProLysGlyGlu	54
179	AAGGAAAGAAGTGTCTAGTTTTCAGAAGTAAAAGATTGGGGGGCAAAGAATGTTATTAAG	238
55	LysGluArgSerValSerPheGlnGluLeuLysAspTrpGlyAlaLysAsnValIleLys	74
239	ATGAGTCCAGCCCCGCAACAAAGTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTGCCCCTGAGATTT	298
75	MetSerProAlaProAlaAsnLysValProHisSerAlaAlaAsnLeuProLeuArgPhe	94
299	GGAAGGACCATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGCAGCACGGGTCAACATGGAGGCAGGGACC	358
95	GlyArgThrIleAspGluLysArgSerProAlaAlaArgValAsnMetGluAlaGlyThr	114
359	AGGAGCCATTTCCCCAGCCTGCCCCAAAGGTTTGGGAGAACAAACAGCCAGAAGCCCCAAG	418
115	ArgSerHisPheProSerLeuProGlnArgPheGlyArgThrThrAlaArgSerProLys	134
419	ACACCCGCTGATTTGCCACAGAAACCCCTGCACTCACTGGGCTCCAGCGAGTTGCTCTAC	478
135	ThrProAlaAspLeuProGlnLysProLeuHisSerLeuGlySerSerGluLeuLeuTyr	154
479	GTCATGATCTGCCAGCACCAAGAAATTCAGAGTCCTGGTGGAAAGCGAACGAGGAGAGGA	538
155	ValMetIleCysGlnHisGlnGluIleGlnSerProGlyGlyLysArgThrArgArgGly	174
539	GCGTTTGTGGAAACAGATGATGCAGAAAGGAAACCAGAAAAATAGGAAACCTCGAGCCCCG	598
175	AlaPheValGluThrAspAspAlaGluArgLysProGluLys***	188
599	ACTTCAAGAGGCTACGGAGC	618
188		188

【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規ポリペプチドなどの提供。

【解決手段】 新規ポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチド等を含有してなる医薬、該ポリペプチドに対する抗体、該ポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物、該化合物を含有してなる医薬など。

【効果】 本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドなどは、例えば、神経疾患治療剤などとして使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のポリペプチドの定量などに使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**